

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2000年 3月27日

出 願 番 号
Application Number: 特願2000-087501

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
the country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2000-087501

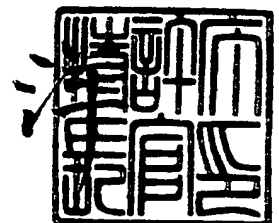
願 人
Applicant(s): オリンパス株式会社

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2005年 5月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 A009906143

【提出日】 平成12年 3月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/534

【発明の名称】 蛍光相関分光法による 1 塩基置換検出方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学工業株式会社内

【氏名】 堀 邦夫

【特許出願人】

【識別番号】 000000376

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100058479

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴江 武彦

【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

【識別番号】 100084618

【弁理士】

【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】**【識別番号】** 100100952**【弁理士】****【氏名又は名称】** 風間 鉄也**【選任した代理人】****【識別番号】** 100097559**【弁理士】****【氏名又は名称】** 水野 浩司**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 011567**【納付金額】** 21,000円**【その他】**

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 0 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構「蛍光相関分光法による 1 塩基置換検出方法」委託研究、産業活力再生特別措置法第 3 0 条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】**【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【包括委任状番号】** 9602409**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光相関分光法による 1 塩基置換検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 1 塩基置換の検出方法であって、

- 1) 1 塩基置換部位を含む検体 DNA と、
前記検体 DNA に含まれると予期される配列に相補的な配列を有し、且つ前記 1 塩基置換部位に対応する塩基に標識物質が付された少なくとも 1 種類の DNA プローブと、
をハイブリダイズすることと；および
- 2) 前記ハイブリダイズの進行中において、複数の経過時点で前記標識物質の位置変化を光学的に測定することと；
を具備する検出方法。

【請求項 2】 1 塩基置換の検出方法であって、

- 1) 1 塩基置換部位を含む検体 DNA と、
前記検体 DNA に含まれると予期される配列に相補的な配列を有し、且つ前記 1 塩基置換部位に対応する塩基に標識物質が付された少なくとも 1 種類の DNA プローブと、
をハイブリダイズすることと；
- 2) 1) で得られた一部が二重鎖である DNA 鎖に校正機能を有する核酸合成酵素を反応することと；および
- 3) 2) の反応において、複数の経過時点での前記標識物質の位置変化を光学的に測定することと；
を具備する検出方法。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 の何れか 1 項に記載の 1 塩基置換の検出方法であって、前記標識物質が蛍光物質である検出方法。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の 1 塩基置換の検出方法であって、前記標識物質の位置変化を光学的に測定する手段が、該蛍光標識物質分子のブラウン運動を蛍光相関分光法により測定すること手段である検出方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】**【発明の属する技術分野】**

本発明は、単一塩基多型(即ち、S N P s)の検出方法に関し、詳しくは、D N Aにおける1塩基置換を検出する方法に関する。

【 0 0 0 2 】**【従来の技術】**

単一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism:以下、S N P sと称する)は、塩基配列中の1塩基が置換されていることにより多型性を示す現象を示す。近年、このような1塩基置換の検出が、疾患関連遺伝子の探索や病気の遺伝子診断において重要な意味を有することが明らかになってきた。

【 0 0 0 3 】

現在では、1塩基置換を検出する方法として、P C R - R F L P、P C R - S S PおよびP C R - S S O等が主に使用されている。これらの方法は、生じたP C R産物を電気泳動によって検出するか、または、9 6 ウェルプレート上に固相したプローブ配列とのハイブリダイゼーション反応を実施することにより検出を行なう方法である。例えば、P C R - S S P法は、夫々、多型的部位を特異的に増幅するプライマー(sequence-specific-primer)試薬を用いて行なう方法である。この方法は、S N P sの判定に頻繁に用いられているが、増幅後、電気泳動で増副産物の存在を確認する必要がある。

【 0 0 0 4 】

また、所謂、D N AチップまたはD N Aアレイ等を応用したV D A (High-Density variant detection arrays)技術によるS N P sの検出も試みられている(Science vol280,15,May 1998)。例えば、D N Aアレイの応用技術である、V D A技術では、多数のプローブD N Aを高密度に固相基板上に配列し、検体D N Aと固相表面でハイブリダイズする方法である。この方法は、固相表面と検体D N Aとのハイブリダイゼーションであるため効率が悪く、長い反応時間を必要とする。更に、一塩基置換ではそのT m値が殆ど変化しないため、高感度にミスマッチを検出することは不可能である。

【 0 0 0 5 】

以上のように、従来使用される何れの方法も煩雑であり、且つ多量のサンプルを必要とするものであり、その実施には長時間を必要とするものである。また更に、従来の方法により得られる検出結果の精度は、実際に臨床的に用いるには不十分である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、高感度且つ高精度な1塩基置換の検出を簡便に行なうことのできる1塩基置換検出方法を提供することである。また、B/F分離、PCRおよび電気泳動等を必要としない、簡便な1塩基置換検出方法を提供することである。更に、本発明の目的は、少量の検体および試薬を用い、所望に応じて複数の多型部位を同時に検出することが可能な1塩基置換検出方法を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、

1塩基置換検出方法であって、

1) 1塩基置換部位を含む検体DNA断片と、

前記検体DNA断片に含まれると予期される配列に相補的な配列を有し、且つ前記1塩基置換部位に対応する塩基に標識物質が付された少なくとも1種類のDNAプローブと、

をハイブリダイズすることと；および

2) 前記ハイブリダイズの進行中において、複数の経過時点で前記標識物質の位置変化を光学的に測定することと；

を具備する検出方法である。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は、DNAにおける1塩基置換を検出するための方法である。本発明の方法は、大きく分けて2工程、即ち、反応工程と測定工程とからなる。

【0009】

前記反応工程は、以下に詳述する通り、検体DNAと、標識したDNAプローブとをハイブリダイゼーションすることと、得られた二重鎖を校正機能を有する酵素で処理することとを具備する工程である。

【0010】

一方、前記測定工程は、以下に上述する通り、前記反応工程の反応系で生じた分子の自由な微小運動を測定する工程である。

【0011】

1. 反応工程

以下、本発明の反応工程を図1から3を用いて説明する。しかしながら、これは例示であり、本発明を何ら制限するものではない。

【0012】

(1) 検体DNA

図1に、本発明の検体DNAの1例を模式的に示した。ここでは、検体DNAが、2つの多型、即ち、多型Iと多型IIで存在する場合を例に説明する。多型Iと多型IIは、1塩基置換部位を除く他の部分の塩基配列は相同である。また、多型Iの1塩基置換部位は、アデニン〔以下、塩基(A)またはAと称し、図中ではAと示す〕であり、多型IIの1塩基置換部位は、グアニン〔以下、塩基(G)またはGと称し、図中ではGと示す〕とする。

【0013】

(2) 標識DNAプローブ

次に、図1に示した1塩基置換部位を検出するためのプローブを図2に示す。プローブIは、多型Iの3'末端から1塩基置換部位までの配列に相補的な配列からなり、且つプローブIの3'末端の塩基(即ち、1塩基置換部位の塩基と対をなす塩基)には、標識物質が付与されている。この例では、プローブIの3'末端は標識されたチミン〔以下、塩基(T)またはTと称し、図中ではTと示す〕である。

【0014】

同様に、プローブIIは多型IIの3'末端から1塩基置換部位までの配列に相補的な配列からなり、且つプローブIIの3'末端の塩基には標識物質が付与

されている。この例では、プローブ I I の 3' 末端は標識されたシトシン [以下、塩基 (C) または C と称し、図中では C と示す] である。

【0015】

(3) 反応工程

本発明の最も簡単な例である第 1 の態様として、試料中に含まれる検体 DNA が、多型 I であるのか、または多型 I I であるのかを検出する例を、図 3 および 4 に例示し、シュミレートする。また、ここでは試料中に多型 I が含まれているとする。

【0016】

夫々のプローブを 2 つの容器に添加して試料と反応させる。図 3 は、容器 I で進行する反応を示す。即ち、図 3 の容器 I では、多型 I とプローブ I を適切な条件下でハイブリダイズする。それにより、多型 I とプローブ I は完全マッチする。一方、図 4 は、容器 I I において進行する反応を示す。即ち、図 4 の容器 I I では、多型 I とプローブ I I を適切な条件下でハイブリダイズする。それにより、1 塩基置換部位でミスマッチが生じる。

【0017】

続いて、前記完全マッチの二重鎖とミスマッチの二重鎖に対して、夫々、校正機能を有した DNA ポリメラーゼを添加する (図 3 および 4)。その結果、完全マッチの二重鎖に対し、前記ポリメラーゼは活性 (即ち、3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性) を示さない (図 3)。それに対して、前記ポリメラーゼは、多型 I とプローブ I I からなる二重鎖の 3' 末のミスマッチを認識し、ミスマッチの塩基を削除する (図 4)。このような酵素活性により、多型 I にミスマッチしたプローブ I I の 3' 末の標識された塩基 (C) が遊離する (図 4)。

【0018】

上述のような反応により得られる標識された分子の自由な微小運動を、後述する測定工程手段により測定する。標識分子の自由な微小運動は、該標識分子の大きさに依存して変化する。従って、標識物質を使用にし、該分子の微小運動を測定することにより標識分子についての情報を得ることが可能である。

【0019】

(4) 用語

ここで使用する「1塩基置換部位」の語は、単一塩基多型間で存在する異なる1塩基の存在する部位または塩基自身を示す。本発明の検出方法では、1つの検体DNAの配列中に、1塩基置換部位が1つ存在しても、また、それ以上で存在しても測定することが可能である。複数の1塩基置換部位を検出する場合には、複数種類の標識物質を使用することが有利である。

【0020】

ここで使用する「校正機能を有する核酸合成酵素」の語は、一部分が二重鎖になった塩基配列の3'末のミスマッチを認識し、その塩基を削除し、且つ適切な条件下で核酸を合成して二重鎖を合成する活性を有する酵素をいう。本発明の方法で使用可能な酵素の例は、校正機能を有する核酸合成酵素であり、好ましい酵素の例は、宝酒造により販売されるEx・TaqまたはLA・Taq等であるが、これに限られるものではない。

【0021】

ここで使用する「標識物質」の語は、異なる測定時点において、略一定の出力を維持するような標識材料を示す。例えば、発光性物質、蛍光物質、磁性物質および放射性物質等である。なお、該標識物質は、後述する測定工程で使用する手段に適切な標識物質を選択するべきである。

【0022】

ここで使用する「自由な微小運動」または「微小運動」とは、ブラウン運動等をいう。

【0023】

(5) 反応工程の他の態様

本発明の検出方法に具備される反応工程の最も簡単な1例は、上述した通りであるが、種々の変更および修飾を行なうことが可能である。例えば、複数の標識物質を用いてもよい。また、標識物質によるプローブの標識は、プローブの3'末だけではなく5'末に対して行なってもよい。また、複数のプローブを1つの容器内で試料に混合して反応を行なうことも可能である。

【0024】

また、校正機能を有する核酸合成酵素によるミスマッチの認識および切断の後で、該切断部から3'末端方向に塩基配列を延伸することも可能である。その場合、適切な条件を設定し、且つ更に必要な基質および試薬等を更に供給してもよく、ポリメラーゼ連鎖反応（以下、PCRと称する）等によって行なってもよい。しかしながら、該延伸を必ずしも行なう必要はない。

【0025】

また、上述した反応を行なう前に、PCRで試料に含有される多型を増幅することも可能である。

【0026】

2. 測定工程

(1) 測定原理

上述の反応工程で得られた標識分子の検出は、後述する工程により実施する。本発明の検出方法に具備される測定工程は、前記標識分子を微小視野において顕微鏡的に測定することと、複数の測定データを時間変化のばらつきに応じた統計学的データに変換することと、統計学的データに基づいてハイブリダイゼーション反応の反応曲線を得ることとを具備する。ここで、反応曲線の立ち上がりの高さが核酸分子の個数を表している。

【0027】

本発明の測定工程が、3次元の微小視野内において実行されることにより、標識分子の試料含有液の中における自由な微小運動を高精度に測定できる。ここで、この測定工程を2次元的な視野内で測定することにより実施した場合、ブラウン運動のように、標識分子の3次元的に自由な移動を漏れなく捕えることができないため測定精度が低くなり、好ましくない。

【0028】

測定工程の微小視野が共焦点光学系により形成されることにより、被写界深度の深い測定データが得られるので、個々の任意の標識分子が視野内で常に合焦して、正確な位置および出力データを測定手段に供給することができる。

【0029】

微小視野が、焦点付近の回折限定領域であることにより、個々の標識分子を高

い S/N 比で測定できる。

【0030】

回折限定が平均直径 $15 \pm 5 \mu\text{m}$ のピンホールにより形成されることにより、少数の選ばれた標識分子からの測定データを高率良く得ることができる。

【0031】

微小領域が平均半径 $200 \pm 50 \text{ nm}$ および光軸上の平均長さ $2000 \pm 500 \text{ nm}$ の略円柱状領域であることにより、測定視野内に照準された標識分子に関する自由な微小運動を効率良く取得することができる。

【0032】

本発明の測定工程では、微小の測定視野内を出入りする標識分子の運動速度を、所定空間内において 1 以上の個々の標識分子から測定される出力強度の増減または消出を指標として測定している。従って、プローブを標識する標識分子の種類は、複数の測定時点において、略一定の出力を維持するような標識材料であるのが好ましい。このような標識分子の材料としては、発光性物質、蛍光性物質、磁性物質および放射性物質等が挙げられる。特に、発光性物質と蛍光物質は、長時間、発光または蛍光を発するような色素を選ぶことが好ましい。標識分子として、発光色素や蛍光色素を有するものを使用すれば、光学的に容易な構成で分子レベルの測定を実施できる。蛍光色素の中では、特に、核酸分子同士の相補的な結合の際に、その相補的結合部分にインターカレートすることによって遊離時とは蛍光特性が変化するものも使用することが可能である。インターカレートに伴ない蛍光特性が変化する蛍光色素としては、アクリジンオレンジ、チアゾールオレンジ、オキサゾールイエロー、ローダミン等がある。

【0033】

測定工程が、蛍光分子の位置変化を測定する場合には、フォトマルチプライヤやフォトダイオード等の蛍光測定手段により蛍光データを受光することができる。蛍光測定手段は、単一フォトン計測し得るような測定モードを備えている方が、蛍光分子に関する個別の測定を実施するのに有利である。

【0034】

本測定工程では、標識分子の液対中の揺らぎ運動を測定することにより、標的

分子の微小運動を正確に測定することができる。揺らぎ運動の測定を行なうに当たっては、自己相関関数 (Autocorrelation function) を用いて演算することが好ましい。特に、標識分子として、蛍光を用いる場合には、自己相関蛍光分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy、以下、F C S と略する) を採用することが好ましい。

【0 0 3 5】

F C S を用いた生物学的材料に関する測定データの演算手法は、標識された核酸プローブと標的核酸分子とのハイブリダイゼーション反応において F C S を利用した報告 (Dinji, M., Rigler, R., Nucleic Acids Research, 23, 1795-1799, 1995) を参照することができる。自己相関蛍光分光法および測定データの演算については、更に後段で記述する。

【0 0 3 6】

F C S を用いた測定では、非常に小さな試料体積に含まれる蛍光粒子の数や拡散定数を、略実時間で、分離過程を経ずに求めることが可能である。即ち、B / F 分離が不要であり、測定に係る時間を短縮することが可能である。また、溶液系で測定することが可能であるため、測定時間を短縮することが可能である。更に、生体分子を自然な状態で測定することが可能である。

【0 0 3 7】

(2) 測定装置

以下、図 5 を用いて、F C S を用いた測定に使用する測定装置について説明する。図 5 に示した F C S 装置は、共焦点光学系を用いた倒立型の蛍光顕微鏡 1 と試料からの蛍光を測定するためのフォトマルチプライヤ 2 と測定データを受信して自己相関関数による演算を行なって数値化またはグラフ化を行なうデータ処理装置 3 と、演算結果を画面上に表示する表示装置 4 とを備えている。

【0 0 3 8】

試料含有液 1 1 は、図 5 に示す通り、試料台 1 2 に載せたスライドガラス 1 3 上に点着させることで簡単にセットできる。この装置では、特に、微量の試料含有液 1 1 を用いるため、水分の蒸発を防止するための蓋 1 4 をスライドガラス 1 3 上にかぶせてある。この蓋 1 4 は、好ましくは光透過性が低いものを用いる。

これにより気密性と遮光性を同時に得られる。但し、蓋の内面は、励起光線の反射を防止するように、できるだけ光射性の低いものを使用することが好ましい。試料含有液 11 が位置するスライドガラス 13 部分の真下には、試料含有液 11 中で焦点を結ぶように設定した対物レンズ 15 が配置される。なお、蛍光顕微鏡 1 は落射型でもよい。落射型においては、対物レンズ 15 のレンズ下面に直接的に試料含有液 11 を点着してもよい。また、蛍光顕微鏡 1 の光源であるレーザ発生装置 16 は、図 5 では、アルゴン (Ar) イオンレーザを使用しているが、蛍光の種類に応じて、クリプトンアルゴン (Kr-Ar) イオンレーザ、ヘリウムネオン (He-Ne) レーザ、ヘリウムカドニウム (He-Cd) レーザ等に種々変更してもよい。また、蛍光顕微鏡 1 におけるスライドガラス 13 の搬入や搬出、スライドガラス 13 等への試料含有液の点着、蓋 14 の開閉等の各種動作は、必要に応じて適宜自動化してもよい。

【0039】

図 6 は、図 5 の蛍光顕微鏡 1 の測定部分を示す拡大図である。図 6 (A) において、スライドガラス 13 と所定の開口数 (図では $NA = 1.2$) の対物レンズ 15 との位置関係により、微小視野領域 20 が形成される。この微小視野領域 20 は、図 6 (B) に示すように、実際には、ボリュームを持ったレーザ光線の焦点 (図では、中間のくびれた部分) から上下に伸びた略円柱状の視野を有している。この視野領域 20 は、焦点を基準位置として、光軸上の長さ Z と平均半径 Y により規定される。このような、微小領域 20 における蛍光測定は、蛍光分子の微小運動を追跡し得る最小の領域にまで小さくすることにより、試料含有液 11 中の焦点付近以外の蛍光分子に由来するノイズを有効に除去し、1 個ずつの蛍光分子を正確に測定することを可能にする。

【0040】

図 6 に示す通りの長さ L および幅 W の共焦点顕微鏡の共焦点領域に出入りする蛍光分子の蛍光強度を 1 分子レベルで捕え、蛍光強度に揺らぎが検出される。この蛍光強度の揺らぎのデータを自己相関関数で変換し、統計学的データを得ることにより、蛍光分子の分子数および大きさが、分子を分離することなく検出することが可能となる。上述の装置により測定したデータをグラフとして図 7 に

示した。図7のグラフは、縦軸に蛍光強度 $I(t)$ を、横軸は時間 (t) を示す。このデータを以下のような自己相関関数で変換すると図8のグラフが得られる。

【0041】

自己相関関数は、

$$G(\tau) : G(\tau) = \langle I(t) I(t+\tau) \rangle \text{であり、}$$

これを平均強度 $\langle I \rangle$ の2乗で規格化し展開すると、

【0042】

【化1】

$$G(\tau)/\langle I \rangle^2 = C(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1+4D\tau/w_x^2} \right) \left(\frac{1}{1+4D\tau/w_z^2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

【0043】

と近似できる。このとき、 $\tau=0$ のとき $C(0) = 1 + 1/N$ 、 D = 拡散定数、 N = 溶液中の分子数である。

【0044】

3. 他の好ましい実施の態様

上述した第1の実施の態様と同様に、しかし、プローブの3'末の塩基分子に付与する標識物質として、プローブの種類毎に、各々蛍光波長の異なる標識物質を付加する。このようなプローブを検体DNAと混合し、第1の実施の形態と同様にハイブリダイズをし、該酵素により、ミスマッチを起こした塩基の削除を行なう。続いて実施するFCSによる検出の際に、異なる波長により、それぞれ解析を行なえば、どのプローブが完全マッチであるかが明確に分り、それと同時にその3'末の塩基の種別が識別され、何れの多型であるかが分る。その結果、より確実に1塩基置換を検出できる。また、異種蛍光を利用する場合には、励起光の波長を変えることにより、または検出部にフィルターを用いることにより検出光の波長を変えることが可能である。

【0045】

【発明の効果】

本発明の1塩基置換検出方法は、簡便且つ短時間で実施することが可能である

。この効果は、本発明の独創的な原理に基づく。即ち、本発明は、目的とする検出を、夫々の多型性に特異的なプローブに標識を付して使用して検体DNAと反応することによって、この反応を分子レベルで捉える。このとき、複数の経過時点で標識物質を測定し、その時間的な位置変化を検出することによって、分子の大きさに依存して変化する位置変化を定量的に検出することが可能になる。従って、従来方法に必要であったB/F分離等の工程や、酵素標識試薬の場合の基質反応等、およびRI標識試薬を用いた場合の放射性感応フィルムへの暴露、並びにPCRおよび電気泳動工程等が不要である。

【0046】

具体的には、従来の方法では、PCRが必須であり、また、電気泳動を行なった際に明確な結果を得るためには、その伸長する長さも200から300bまで行なうことが好ましいとされている。しかしながら、本発明では、電気泳動を必要としないのでPCRを行なう必要はない。しかしながら、より確実性を求めて、PCRを行なう場合であっても、10から30bの伸長によって十分に確実なデータを得ることが可能である。

【0047】

本発明の検出方法は、検体量および試薬量とも非常に少量のみを用いて実施することが可能である。具体的には、検体として用いる試料はフェムトリットル (fL) レベルで充分である。即ち、これは、上述した通り、本発明の方法における、発光信号の検出領域が、半径200nmおよび軸長2000nmの微量領域であるためである。これにより、本検出は、極小型の容器で多数の検体を同時に測定することが可能であり、検査に要する検体量および酵素試薬等の検出に必要な試薬を低減することが可能である。

【0048】

また、本発明の方法は、同一容器内で異なる多型部位に特異性を有する複数の試薬を混合し、同時に検体に対して処理することが可能である。従って、検体DNAの必要量の低減、および反応容器数の低減が可能である。また、多型遺伝子検査の検査工程の簡便化が可能である。更に、本検出方法は、少なくともDNA検体と試薬の混合のみで実施することが可能であるため、全自動のシステム化も

可能である。

【0049】

本発明の検出方法は、高感度に1塩基置換を検出することが可能である。また本方法は、バックグラウンドの影響が少ないホモジニアス系であるため、判定精度が高い。これは本発明の検出原理に基づくものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の方法で検出する検体DNAの1例を模式的に示す図。

【図2】

本発明の方法で使用するプローブの好ましい1例を模式的に示す図。

【図3】

本発明の検出方法を示すスキーム図。

【図4】

本発明の検出方法を示すスキーム図。

【図5】

本発明の検出方法に用いる装置の好ましい態様を示す図。

【図6】

本発明の検出方法に用いる蛍光顕微鏡の測定部分を示す図。

【図7】

本発明の検出方法で得られる蛍光強度の時間的変化のデータを示すグラフ。

【図8】

図7のデータを自己相関関数で変換した統計学的データを示すグラフ。

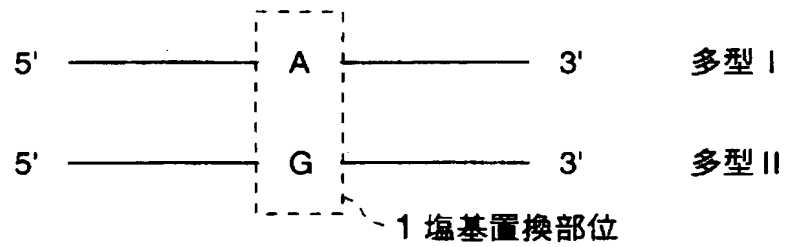
【符号の説明】

- | | | |
|----------|---------------|-------------|
| 1. 蛍光顕微鏡 | 2. フォトマルチプライヤ | 3. データ処理装置 |
| 4. 表示装置 | 11. 試料含有液 | 12. 試料台 |
| | 13. スライドガラス | |
| 14. 蓋 | 15. 対物レンズ | 16. レーザ発生装置 |

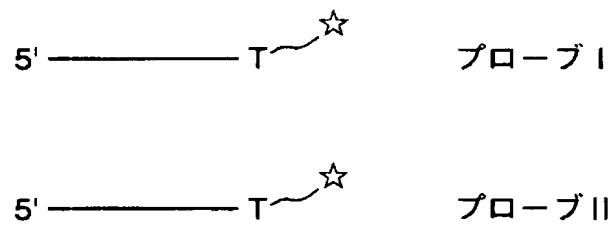
【書類名】

図面

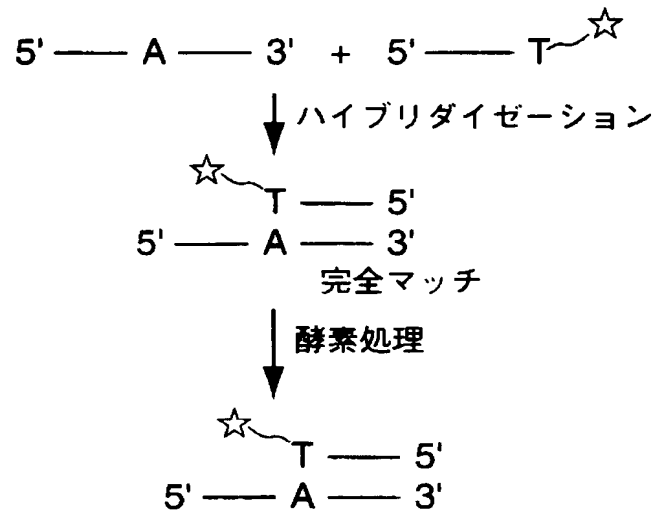
【図 1】



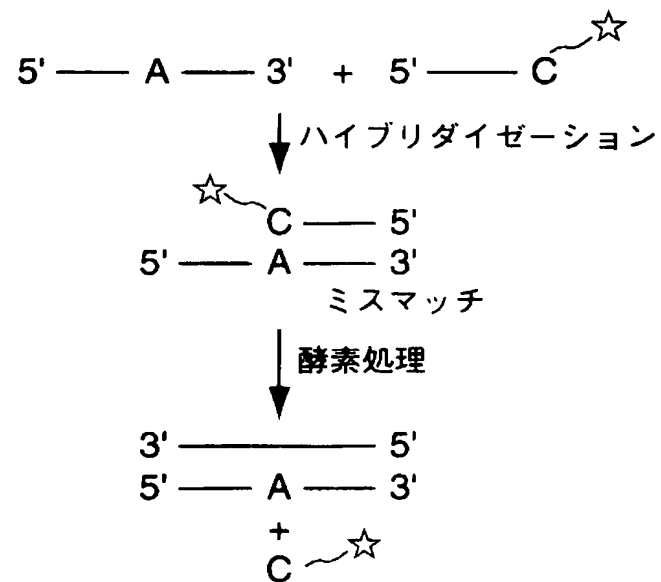
【図 2】



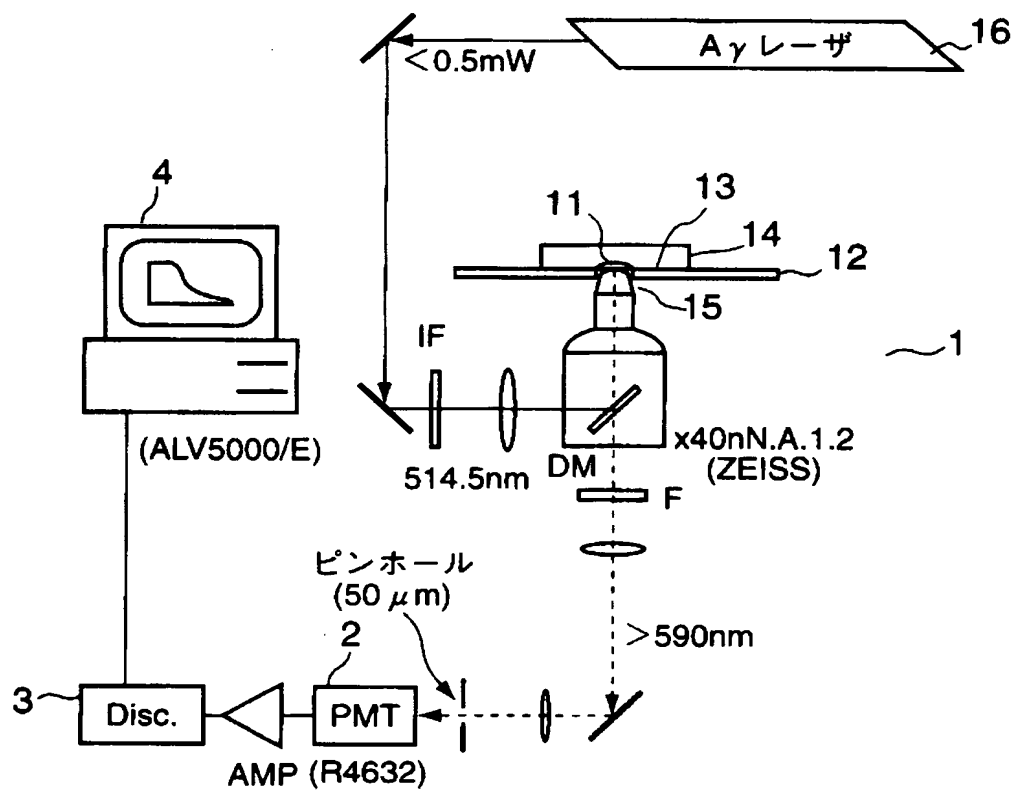
【図 3】



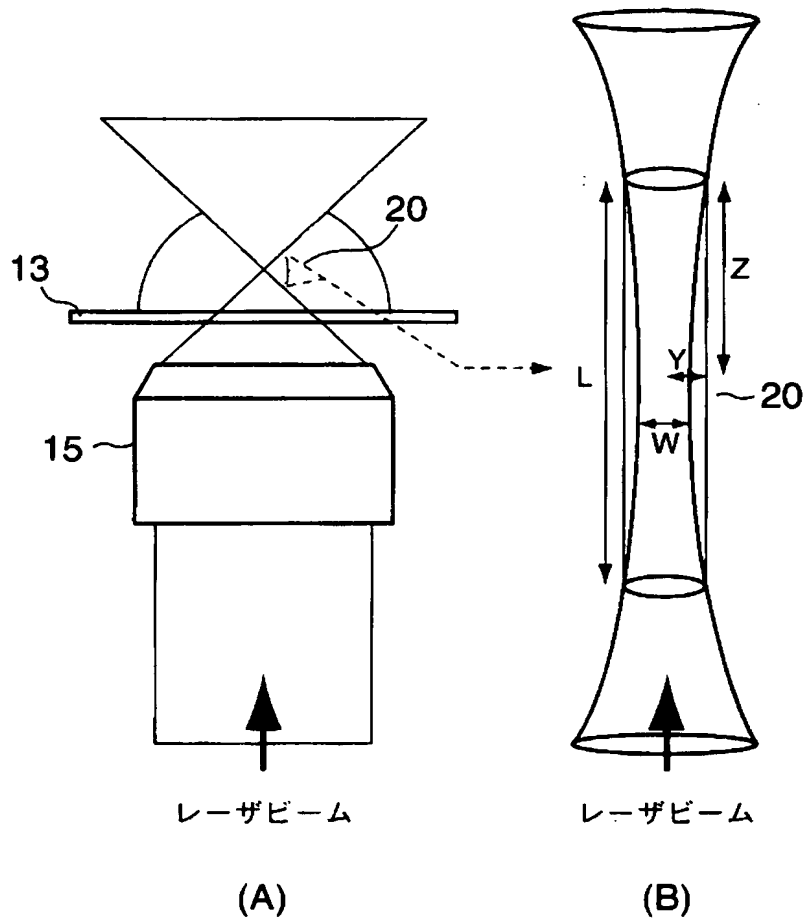
【図 4】



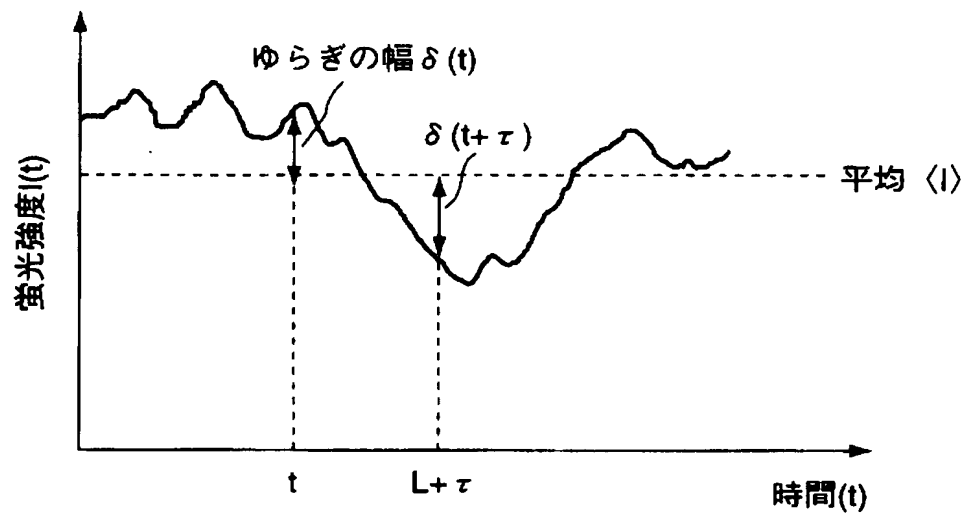
【図 5】



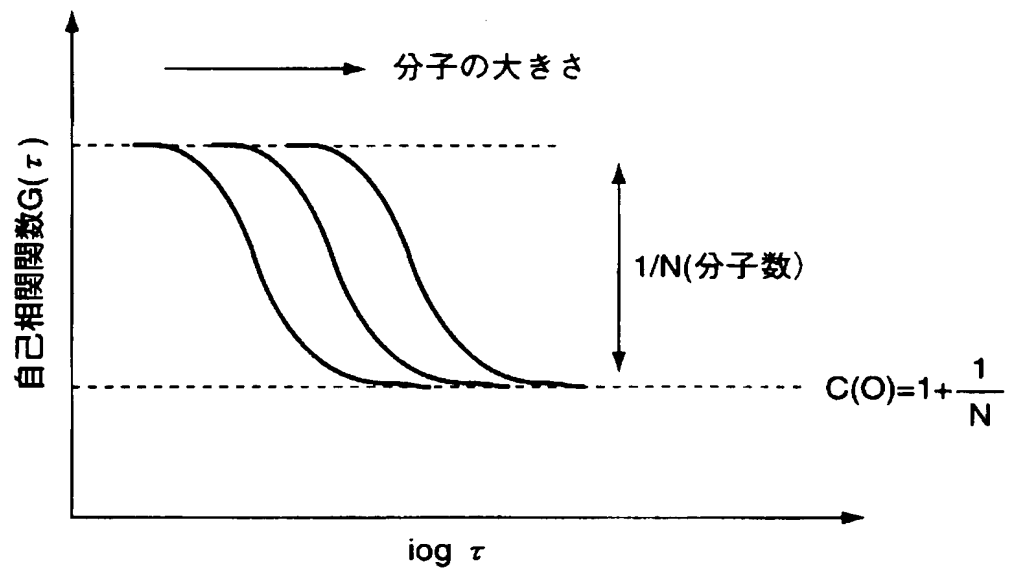
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高感度且つ高精度な 1 塩基置換の検出を簡便に行なうことのできる 1 塩基置換検出方法を提供する。また、B/F分離、PCRおよび電気泳動等を必要としない、簡便な 1 塩基置換検出方法を提供する。更にまた、少量の検体および試薬を用い、所望に応じて複数の多型部位を同時に検出することが可能な 1 塩基置換検出方法を提供する。

【解決手段】 1 塩基置換の検出方法であって、

- 1) 1 塩基置換部位を含む検体 DNA と、
前記検体 DNA に含まれると予期される配列に相補的な配列を有し、且つ前記 1 塩基置換部位に対応する塩基に標識物質が付された少なくとも 1 種類の DNA プローブと、
をハイブリダイズすることと；および
- 2) 前記ハイブリダイズの進行中において、複数の経過時点で前記標識物質の位置変化を光学的に測定することと；
を具備する検出方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 0 - 0 8 7 5 0 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 3 7 6]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 0 日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号
氏 名 オリnpas 光学工業株式会社
2. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由] 名称変更
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号
氏 名 オリnpas 株式会社